

水産分野におけるメタゲノム研究の現状と将来展望

長井 敏

国立研究開発法人水産総合研究センター中央水産研究所
水産遺伝子解析センターメタゲノム研究グループ長

小林 敬典

国立研究開発法人水産総合研究センター研究推進部
研究開発コーディネーター

乙竹 充

現 国立研究開発法人水産総合研究センター増養殖研究所業務推進部長
旧 国立研究開発法人水産総合研究センター中央水産研究所
水産遺伝子解析センター長

1. はじめに

メタゲノム解析では、様々な環境下の生物相を、その環境に含まれる「遺伝子(DNA)断片の塩基配列」により網羅的に測定・評価する。そのためメタゲノム解析では、個々の生物を「形態や能力」で把握する従来の方法と異なり、小さな微生物から物陰に隠れている魚介類まで、目で見えないあるいは見えにくい生物までをも網羅的に捉えることができる。特に、これまで研究手法が乏しかった難培養性微生物の研究に道が開かれたことは画期的である。なぜなら、海洋微生物の大部分はいまだに分離・培養されておらず、今後も単離は困難と考えられているからである。

メタゲノム解析の発想自体はDNAの発見直後から存在したと考えられるが、科学論文は西暦2000年以前にはほとんど無く、研究として一般的になったのは、つい最近のことである。その研究の発展には、近年飛躍的に性能が向上したDNAシーケンサー（次世代シーケンサー、Next Generation Sequence）が大きく貢献している。次世代シーケンサーの圧倒的な処理能力と低コストの活用により、メタゲノム研究は産業の役に立つレベルに達しつつある。

主として天然環境で成長・繁殖する魚介類を活用する水産分野において、環境の評価および管理は極めて重要である。遠洋から沿岸までの各種漁場の形成、赤潮や貝毒、魚病の発生、藻場や珊瑚礁の消失や回復等々、水産業に大きなインパクトを与える現象の多くは、環境に大きく依存している。そのため、最新の環境評価手法であるメタゲノム解析は、水産分野の様々な場面に活用できる。本講では、前半に、これまで実施してきたメタゲノム解析によるプランクトンモニタリングの成果の一部を紹介し、

後半部分は、水産分野の5つの重点領域、「わが国周辺および国際水産資源の持続可能な利用のための管理技術の開発」、「沿岸漁業の振興のための水産資源の積極的な造成と合理的利用ならびに漁場環境の保全技術の開発」、「持続的な養殖業の発展に向けた生産向上技術と環境対策技術の開発」、「水産物の安全・消費者の信頼確保と水産業の発展のための研究開発」、「基盤となるモニタリングおよび基礎的・先導的研究開発」について、どのようなメタゲノム研究が進められているのか、その現状と将来展望について述べたい。

2. メタゲノム研究の成果

最近の研究で藻類は、およそ11の植物門から構成されており、細胞の形態、葉緑体の組成と構造、鞭毛装置の構造・機能、生活環、遺伝子配列などが、分類の基準となっている。比較的大型の植物プランクトンでは、遺伝子情報は充実してきたが、採集地点等の詳細な情報が登録されておらず、10ミクロンより小型の超微細種の情報になると、何種類いるのか未だに不明である。日本の沿岸域に普遍的に出現する珪藻で20,000種、渦鞭毛藻で2,000種、ハプト藻で2,000種、クリプト藻・ユーグレナ藻で共に800種、藍藻で2,000種程度は存在すると見積もられている¹⁾。特に小型の海産珪藻、ハプト藻、クリプト藻、ユーグレナ藻では未記載種が多く、その遺伝子情報の蓄積は極めて乏しい状況にあると言える。動物プランクトン・無脊椎動物群は植物プランクトン同様、極めて多様な動物群を含み、分布域、生活史などの生態も多様性に富んでおり、原生動物を除いた種で7,000種、このうちカイアシ類で2,000種類、原生動物2,700種が存在すると言われている（日本産生物種数調査）。実際には、その数倍の種数の存在が推定されている。動物プランクトンに特化したデータベースとして **Census of Marine Zooplankton (CMZ)** が知られており、形態と遺伝情報の総合化を目指した取り組みが行われている²⁾。

各都道府県や市の海洋研究機関が1970年代前半から、環境モニタリングを実施しており、動植物プランクトンのデータは蓄積されてきたが、優占種の情報がほとんどであり、レア種や微細な植物プランクトンの情報はほとんどない。次世代型と呼ばれるシーケンサーは、従来型シーケンサーの千倍～数万倍の性能を発揮する。シーケンス革命の到来により、メタゲノムから“ペタゲノム”という言葉が使われる時代になり、従来の形態情報を重視していたモニタリングのスタイルに加え、大量に得られるゲノム情報をフル活用した革新的なスタイルも導入していく必要がある。次世代型シーケンサーは、一度に大量の配列を取得することが可能だが、同時に大量のエラー配列も発生する。このため、バイオインフォマティクス技術を駆使したエラー除去や種同定の技術が必要となるが、使用するプログラムも研究者により統一が取れていない状況にある。当研究室では、既に、高精度でメタゲノム解析をすることができるプログラムを完成させ、それを用いてメタゲノム解析を実施しており、多数の原著論文として発信されつつある³⁻⁶⁾。

2009年に広島湾・石垣島から海水をそれぞれ5回採取し、それぞれヌクレポアフ

フィルター上に動植物プランクトンを捕集した後 DNA を抽出、これを鋳型として核 18S-rDNA の部分配列をユニバーサルプライマーにより増幅（約 500bp）し、次世代シーケンサー Roche 454 により配列解析を行った。得られた配列につき Blast 検索を行い、出現種の同定を試みるとともに、広島湾と石垣島における出現種の違いを比較した。検出された OTU（Operational Taxonomic Units、異なる配列数で出現種数の目安となる）数は 102～212 の範囲にあった。サンプル毎にスーパーグループレベルでの出現頻度を比較すると、広島湾では、アルベオラータとストラメノパイルが優占的に出現し、次世代シーケンサーで読まれた遺伝子断片数（NGS 数）で 70～80（平均 71.1）%、OTU 数で 70～75（平均 71.5）%を占めた（図 1）。

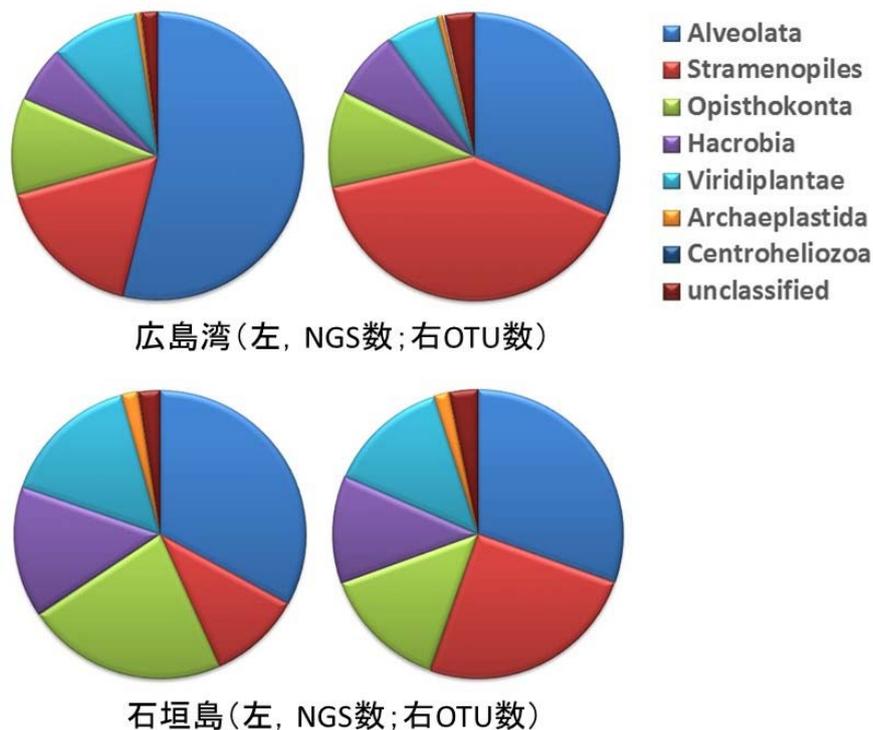


図 1. 広島湾および石垣島におけるスーパーグループの出現頻度について

これは、広島湾において渦鞭毛藻と珪藻が優占していることを示しており、沿岸域の大きな特徴として知られる^{7,8)}。一方、石垣島ではアルベオラータ（渦鞭毛藻）とストラメノパイル（珪藻）の出現頻度は、NGS 数で 30～60%（平均 45%）、OTU 数で 50～65%（平均 56%）と広島湾よりかなり低く、代わりにオスピトコンタ（動物プランクトン）やハクロビア（クリプト藻やハプト藻）といったグループが多数検出された。今回は、NGS 取得配列数が十分ではなかったにもかかわらず、20 網以上もの藻類が検出されており、次世代型シーケンサーを活用したメタゲノム解析がいかにパワフルな検出手法であることが判る。また、ヒートマップ+クラスタリング解析の結果をみると、両海域で共通して出現する種、片方の海域のみで優占的に出現する種が存在することがよく判り（図 2 左）、1 サンプルのみで出現した種も見られた。今回のサンプ

リングは、1ヶ月に1回程度の間隔で実施したが、通常、プランクトン出現種の変遷

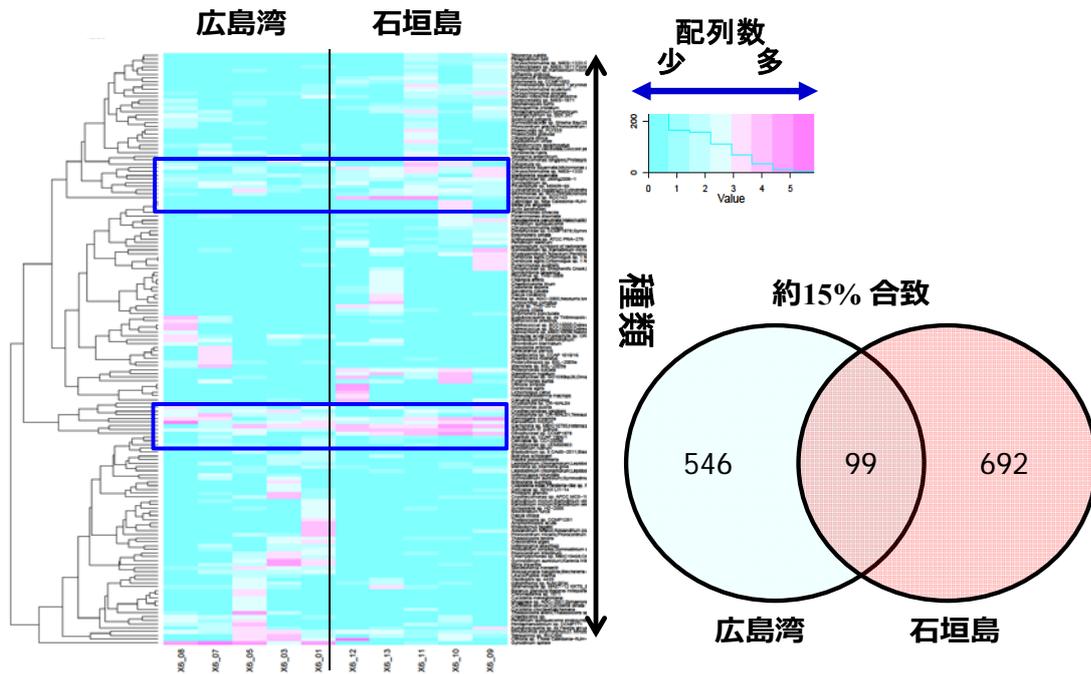


図2. ヒートマップ+クラスタリング解析の結果（左図、青色枠は両海域で出現した種）およびベン図（右図、約15%のOTUが両海域から検出される）

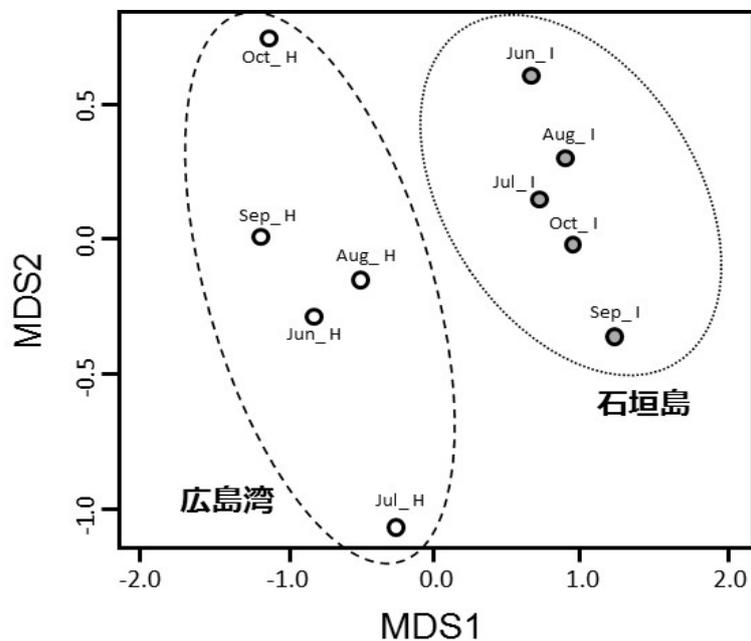


図3. 類似度指数を用いたNMDS (non-metric multidimensional scaling) 解析の結果

は、数日から2週間程度で生じることから、そういった出現種の違いを反映した結果と考えられる。広島湾、石垣島サンプルから、それぞれ645個、791個のOTUが検出され、99個が両海域から検出され546個が広島湾のみで、692個が石垣島のみで検出された(図2右)。類似度指数を用いたNon-metric multidimensional scaling(NMDS)解析をすると、両海域のサンプルは、海域ごとにまとまっており、この結果は、それぞれ海域特有のプランクトン組成の差異を示すと考えられる(図3)。広島湾は温帯域、石垣島は亜熱帯域に位置し、それぞれ固有の生物群が分布する結果を反映したものと思われる。Corresponding解析の結果は、NMDS解析と同様に、広島湾と石垣島では、出現する生物群が異なること、加えて、広島湾サンプルではプランクトン群集の明瞭な季節的出現特性が検出されたが、石垣島ではそれが見られない(図4)。以上のように、従来の研究手法だと、1個の海水サンプルからは、20、30種しか出現種を記載できなかったことに対して、メタゲノム解析を行うと、数百のレベルで出現種の把握と時系列的なモニタリングが可能である。

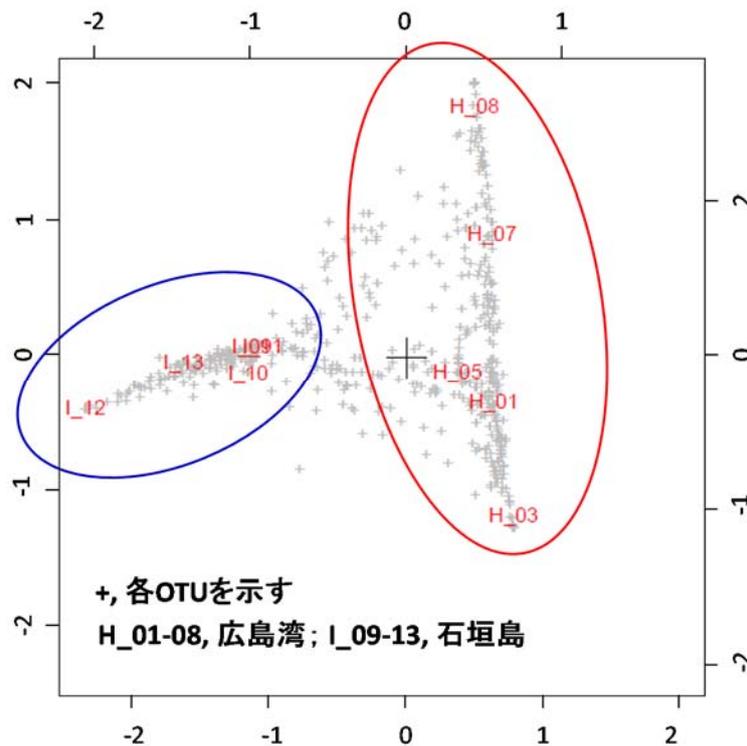


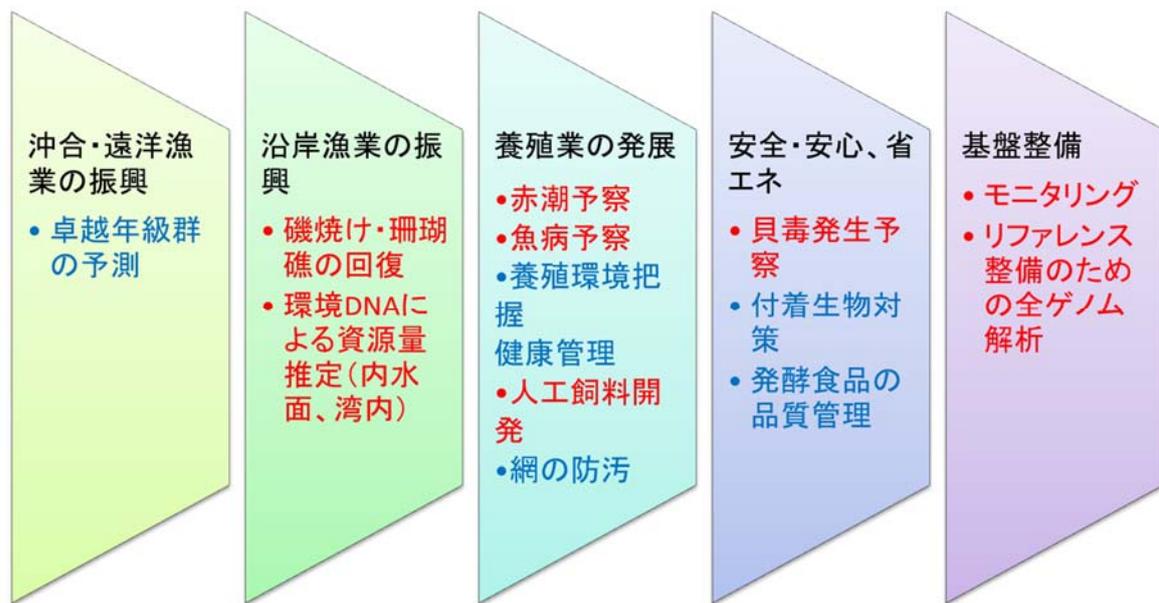
図4. Corresponding解析の結果(広島湾と石垣島に出現する生物群が異なること、広島湾では明瞭な季節的出現特性が見られることを示す)

3. 水産分野の重点領域へのメタゲノム解析技術の導入

水産総合研究センターが中期目標で掲げる水産分野の5つの重点領域において、現在、既に複数のメタゲノム研究プロジェクトが走っており、精力的に研究が進められている(図5)。

① わが国周辺および国際水産資源の持続可能な利用のための管理技術の開発

稚魚や動物プランクトンの餌となる低次生物の生産ポテンシャルを評価するためのメタゲノム解析は必要であり、また、イワシ、サンマ、アジ、ドビウオ、スケソウダラ等の水産重要資源の餌生物特定など、メタゲノム技術による解析が必要であり、研究が進められつつある。これについては、水産総合研究センター所内プロジェクト研究「大型プランクトンのメタゲノム解析技術の開発」、運営費交付金「日本産ウナギ幼生の餌生物特定」、国際水産資源研究所の所内プロジェクト研究「パイロシーケンス法を用いた主要餌料生物の定量評価に向けた測定系の開発」が該当する。



2014年4月、中央水産研究所水産遺伝子解析センターにメタゲノム研究グループを新設

図 5. 水産分野におけるメタゲノム研究の活用

②沿岸漁業の振興のための水産資源の積極的な造成と合理的利用ならびに漁場環境の保全技術の開発

磯焼けによる磯根資源の枯渇や、赤土流出、富栄養化によるサンゴ礁の劣化が大きな問題になっており、その海域にどういった海藻が何種類くらい分布しているかといった研究や、磯焼けが生じた海域の生物が何も付着していないように見える磯にどういった海藻が付着しているか、サンゴ礁域の海水中にどのようなプランクトンが出現するのか、稚サンゴの付着する海底付近にどのような生物が分布し、サンゴの成長が見られる地点と砂漠化が続いている地点とでは生物相がどう異なるのかといった研究を進めている。さらに、近年、魚等の分布密度や資源量を推定するため、環境DNA分析という新たな研究分野が生まれ、既に湖沼などの外来種の存在の有無を検出したり、絶滅危惧種の検出に活用されている。水産分野では、日本ウナギの資源量が極端に低

下しており、環境DNAを用いた分布量推定や資源量推定に関する研究が進められつつある。これについては、農林水産技術会議委託プロ研である「生態系ネットワーク修復による持続的な沿岸漁業生産技術の開発」、環境省の環境研究推進費「島嶼－サンゴ礁－外洋統合ネットワーク系動態解明に基づく石西礁湖自然再生への貢献」などが該当する。

③持続的な養殖業の発展に向けた生産向上技術と環境対策技術の開発

沿岸域における漁場環境の把握は、人間と自然が共存するために重要な研究課題である。有害赤潮、魚病の問題があり、現在もなお、年間数十億円といった巨額の漁業被害が生じる場合がある。有害赤潮や魚病の発生を1日でも早く予測し、大きな被害を未然に防止するため、農林水産技術会議委託プロ研である「海洋微生物解析による沿岸漁業被害の予測・抑制技術の開発」が進められている。これは、有害赤潮対象種の発生・増殖・消滅時に発生する微生物叢をメタゲノム解析により網羅的に検出し、有害種の発生に関わる微生物群を特定すること、それをモニタリングすることで発生予測を行おうとする研究である（図6）。これは、魚病細菌においても同様の研究が進められており、新しい知見が得られつつある。さらに近年、腸内環境という言葉が人間の健康管理に重要であることが研究で明らかにされており、腸内細菌フローラの管理と健康の問題が、マスコミ等でも大きく取り上げられている。養殖魚の腸内環境を研究するために、養殖魚の腸内細菌フローラをメタゲノム解析でモニタリングする研究の取り組みも開始されている。



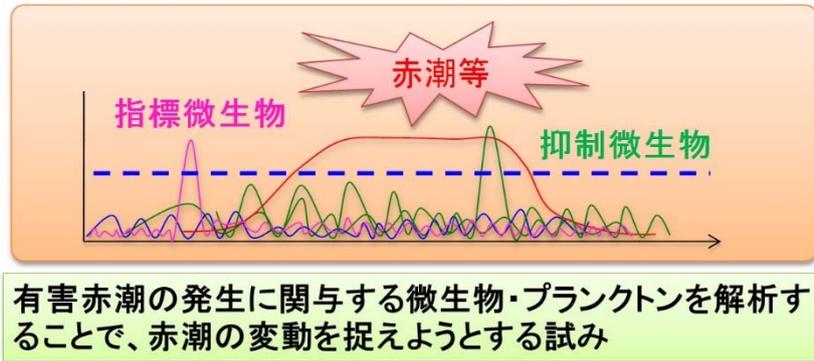


図 6. メタゲノム解析による有害赤潮の発生に関与する微生物群の特定に関する研究

④水産物の安全・消費者の信頼確保と水産業の発展のための研究開発

水産物の安全・消費者の信頼確保のためには、貝毒発生、食中毒発生、発酵食品の品質管理等の解決すべき問題があり、これらにもメタゲノム技術を活用すべく研究が進められている。あるいは、巨大なタンカーやフェリーの船底付着物の問題も、解決されていない研究課題として指摘されており、付着生物叢の把握や船底塗料などの効果を確認するには、メタゲノム解析が最適であり、今後の研究の進展が期待される。

⑤基盤となるモニタリングおよび基礎的・先導的研究開発

日本沿岸域に分布・出現する種を網羅的に記録するため、最北端としてオホーツク海の冷水域（紋別市オホーツクタワー）、最南端として石垣島周辺海域の亜熱帯のサンゴ礁域、その他として瀬戸内海（広島湾、大阪湾）、英虞湾、八代海、鹿児島湾を温帯域の対象海域として、週1回～月1回の間隔でメタゲノム解析技術を用いたモニタリングを実施している。また、静岡県御前崎定点においては、中央水産研究所 海洋・生態系研究センターと共同で、水産総合研究センター所内プロジェクト研究、「メタDNA/RNA解析による黒潮域プランクトン群集モニタリングの高度化」を実施している。この研究課題では、年複数回、東経138度線上に一定間隔で設定した観測点（北緯30～34.5度）において、表層から 3,000 mまでの24層で採水しており、得られた海水中に出現したプランクトンについてメタゲノム解析を大規模に実施している。これにより、表層から深海までの生物叢を網羅解析し、生物の分布や出現動態の違い、深海生物の特徴の解明を目指しており、さらに、黒潮より沿岸よりの海域、黒潮流軸、黒潮より沖合域の生物相の違いを解析中である。

4. メタゲノム研究の将来展望

以上、水産総合研究センターが中期目標で掲げる水産分野の5つの重点領域において、複数のメタゲノム研究プロジェクトが実施されてきており、これらの遺伝子情報と環境データは、海洋ビッグデータとして蓄積中である。今後の研究の進捗により、さらなるデータの巨大化が容易に予想されることから、巨大なコンピューターサーバ

ーを用いたデータベースの管理・運用をより効率的に行う技術開発も緊急を要する課題である。次世代型シーケンサーは、現在、第3、第4世代型が開発されており、企業間で激しい開発競争が展開されている。これら日進月歩の技術を上手く活用し、水産分野の5つの重要研究分野に利用していくために、新しい分野を開拓するための斬新な発想とアイデアが必要となる。

この中で、我々は、2つの方向性を考えた研究の展開を目指している。一つは、海洋観測にメタゲノム解析を加えた自動観測による海洋ビッグデータの管理の拠点化、複数の研究機関で取得された環境+メタゲノムデータを一か所で集中管理し、データベースの管理と運用を行う。ユーザーには要望に応じて解析を行い、解析データを提供する（図7）。これにより、日本沿岸域に設置した自動観測ブイからリアルタイムで生物環境データが送付され、蓄積される。これにより、日本沿岸域に出現する生物

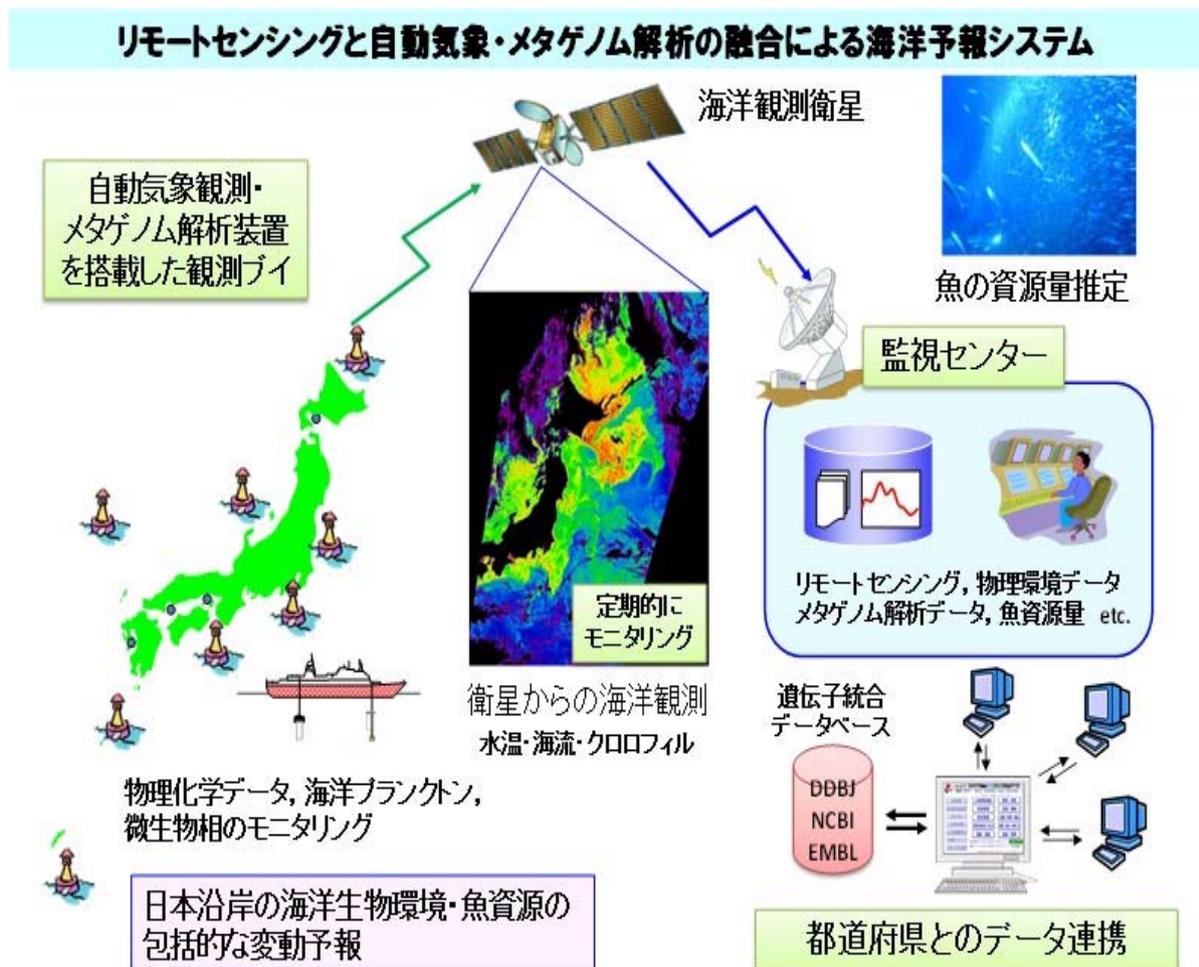


図7. メタゲノム解析技術の将来展望の概念図（自動観測による海洋ビッグデータの収集・管理・解析の拠点化を図る）

生物群集ネットワークモデル等の汎用ソフト開発による 沿岸生物モニタリングの高度化

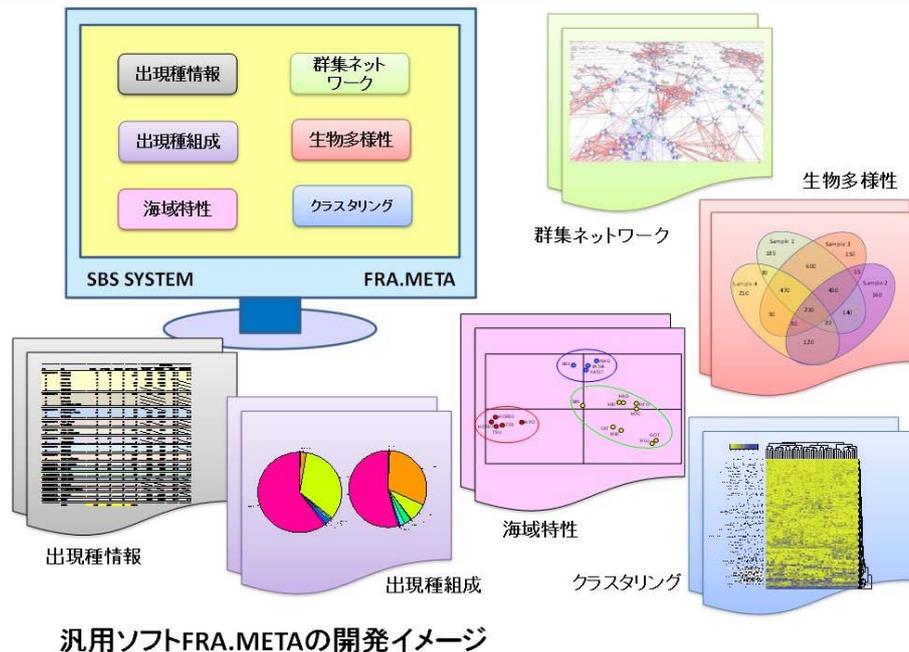


図 8. ユーザーフレンドリーなメタゲノム解析ソフトのイメージ（経験がなくとも複数のボタンをクリックするだけで解析から表、グラフ作成が可能）

の網羅的な記録が可能となるだろう。二つ目は、日本の沿岸海洋生物モニタリングの主導者が各都道府県や市のモニタリング研究者であることから、NGSを用いたメタゲノム解析の技術を都道府県等の海洋モニタリングに導入・普及させることを計画している（図8）。つまり、サンプリングからメタゲノムデータの取得、その解析までを独自で実施可能な状態にする技術の提供である。通常、NGSを用いたメタゲノム解析には、バイオインフォマティクスを駆使した高度な解析技術やノウハウが必要となるが、ユーザーフレンドリーな解析ソフトを開発し、これを安価で提供することで、経験がなくとも誰でも簡単に同じ基準でメタゲノム解析が可能となる。この実現に向けた取り組みとして、科研費基盤研究B「ユーザーフレンドリーな新規海洋生物多様性測定システムの開発」の中で、ユーザーフレンドリーな解析ソフトを開発中で、現在、開発にほぼ目途が立った状況にある。

引用文献

- 1) 渡辺 真、宮下英明、中山 剛、他：藻類の多様性と系統、バイオディバーシティ・シリーズ 3、第 III 部. 植物群ごとの特徴. 裳華房、160-296、1999. 単行本.
- 2) 西田周平、Lindsay DJ、町田龍二. 全海洋動物プランクトンセンサス (Census

- of Marine Zooplankton: CMarZ) の成果と展望. 日本プランクトン学会報 56: 129、 2009.
- 3) 長井 敏・飛田晃介・漆崎慎吾・田邊晶史ほか. メタゲノミクスによるプランクトンモニタリングの実践 (植物プランクトンを中心に). 日本プランクトン学会報 62: 1-8 (2015).
 - 4) Nagai S, Urushizaki S, Yasuike M, Nakamura Y, Fujiwara A, Takano Y, Tanabe AS, Hongo Y, Katakura S. Plankton metagenomics in Okhotsk Sea. The proceedings of the 30th international symposium on Okhotsk Sea & Sea Ice, 31-34 (2015).
 - 5) Hirai J, Yasuike M, Fujiwara A, Nakamura Y, Hamaoka S, Katakura S, Takano Y, Nagai S. Effects of plankton net characteristics on metagenetic community analysis of metazoan zooplankton in a coastal marine ecosystem. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 469: 36-43 (2015).
 - 6) Majaneva M, Hyytiäinen K, Varvio SL, Nagai S, Blomster J. Different bioinformatic amplicon read processing strategies have a strong effect on eukaryotic diversity and taxonomic community composition results. *PLoS ONE* (in press).
 - 7) 眞鍋武彦、反田 実、堀 豊、他 : 播磨灘の漁場環境と植物プランクトンの変動 20 年間のモニタリングの成果. 沿岸海洋研究ノート、31: 169-181, 1994.
 - 8) Nishikawa T, Hori Y, Nagai S, et al.: Long-term Phytoplankton Dynamics in Harima-Nada, Eastern Seto Inland Sea, Japan During a 35 year period from 1973 to 2007. *Estuaries and Coast*, 33: 417-427, 2010.